

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/90, 15/85, 15/89</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/07227</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 27. Februar 1997 (27.02.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE96/01518 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 14. August 1996 (14.08.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 30 107.2      16. August 1995 (16.08.95)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> SCHÜTZ, Günther [DE/DE]; Zeppelinstrasse 84, D-69121 Heidelberg (DE). LICHTER, Peter [DE/DE]; Am Großen Wald 36, D-69251 Gaiberg (DE). MONTOLIU, Lluís [ES/ES]; Passeig Fabra i Puig, 309, E-08031 Barcelona (ES).  <b>(74) Anwalt:</b> SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> ACCURATE CELLULAR DNA ALTERATION PROCESS  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR GEZIELTEN VERÄNDERUNG VON ZELL-DNA  <b>(57) Abstract</b>  An accurate cellular DNA alteration process is characterised in that large DNA fragments are introduced into cells and the cellular DNA is altered by homologous recombination with the large DNA fragments. Also disclosed is an agent for carrying out this process.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Veränderung von Zell-DNA, das dadurch gekennzeichnet ist, daß große DNA-Fragmente in Zellen eingebracht werden und die Zell-DNA durch homologe Rekombination mit den großen DNA-Fragmenten verändert wird. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Mittel zur Durchführung eines solchen Verfahrens.		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

### Verfahren zur gezielten Veränderung von Zell-DNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Veränderung von Zell-DNA sowie ein hierfür verwendbares Mittel.

Seit langem werden Versuche unternommen, Zell-DNA zu verändern. Beispielsweise werden Viren, insbesondere Retroviren, oder Teile davon als Vektoren verwendet, Gene in Zell-DNA einzubringen. Sämtlichen Versuchen mangelt es allerdings daran, daß die Gene nicht gezielt mit hoher Häufigkeit und ohne Selektion in die Zell-DNA, d.h. an definierte Stellen dieser, eingebracht werden können. Dies ist aber unerlässlich, wenn einzelne Bereiche einer Zell-DNA genau verstanden bzw. bei Vorliegen von Defekten therapiert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Zell-DNA mit hoher Häufigkeit und ohne Selektion gezielt verändert werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände der Patentansprüche erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur gezielten Veränderung von Zell-DNA, das sich dadurch auszeichnet, daß große DNA-Fragmente in Zellen eingebracht werden und die Zell-DNA durch homologe Rekombination mit den großen DNA-Fragmenten verändert wird.

Der Ausdruck "Zell-DNA" umfaßt jegliche DNA von Zellen, wie chromosomale und extrachromosomale DNA.

Der Ausdruck "große DNA-Fragmente" umfaßt DNA-Fragmente jeglicher Art, die

- 2 -

zu Bereichen einer Zell-DNA ausreichend homolog sind, so daß eine homologe Rekombination zwischen der Zell-DNA und den DNA-Fragmenten erfolgen kann, und mehrere 100 Kilobasen (kb), vorzugsweise etwa 700 kb oder mehr und besonders bevorzugt etwa 1000 kb oder mehr aufweisen. Die großen DNA-Fragmente können im ganzen oder teilweise mit der Zell-DNA homolog rekombiniert werden.

Vorzugsweise umfassen die DNA-Fragmente regulatorische, kodierende und/oder nicht-kodierende Sequenzen. Diese Sequenzen können von der DNA eines oder mehrerer Gewebe bzw. Organismen stammen. Auch können die Sequenzen künstlicher Art sein, d.h. nicht in der Natur vorliegend. Vorzugsweise kodieren die Sequenzen für ein oder mehrere Gene bzw. Teile davon. Diese Gene bzw. ihre Teile können in Wildtyp- oder veränderter Form vorliegen. Letzterer Fall umfaßt Mutationen, wie Additionen, Inversionen, Deletionen und/oder Substitutionen von ein oder mehreren Basenpaaren.

In bevorzugter Ausführungsform umfassen die DNA-Fragmente Elemente, die zu ihrer Stabilität und/oder Replikationsfähigkeit beitragen. Solche Elemente sind insbesondere ein Telomer, ein Zentromer und/oder ein Replikationsursprung. Diese Elemente können von der DNA eines oder mehrerer Gewebe bzw. Organismen stammen. Vorzugsweise stammen die Elemente von menschlicher-, Hefe-, und/oder bakterieller DNA. Besonders bevorzugt stammen die Elemente von YAC ("yeast artificial chromosome")- oder BAC ("bacterium artificial chromosome")-DNA. DNA-Fragmente mit YAC- oder BAC-DNA sind daher ganz besonders bevorzugt. Vorstehende DNA-Fragmente sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, vorstehende DNA-Fragmente herzustellen. Dies sind z.B. Verfahren, durch die Zell-DNA isoliert und derart gespalten werden kann, daß DNA-Fragmente einer Größe von mehreren 100 Kilobasen (kb), insbesondere von etwa 700 kb oder mehr und ganz besonders von etwa 1000 kb oder mehr, erhalten werden. Desweiteren sind dies z.B. Verfahren, durch die diese DNA-Fragmente mit Elementen kombiniert werden können, die

- 3 -

zur Stabilität und Replikationsfähigkeit der DNA-Fragmente beitragen. Insbesondere kennt der Fachmann Verfahren, diese Elemente von menschlicher-, Hefe- und/oder bakterieller DNA, besonders von YAC- oder BAC-DNA oder diese DNAs als solche zu verwenden.

Erfindungsgemäß werden vorstehende DNA-Fragmente in Zellen eingebracht. Dies können z.B. befruchtete Oozyten oder somatische Zellen, wie Stammzellen, z.B. hämapoetische Stammzellen, sein. Die Zellen können von Mensch oder Tier, insbesondere Labortier, wie Maus, Kaninchen, Ratte, und Nutztier, wie Rind, Schaf, stammen. Das Einbringen der DNA-Fragmente in die Zellen kann durch übliche Verfahren, wie Mikroinjektion erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß Zell-DNA verschiedenster Lebewesen gezielt verändert werden kann. Dies wird durch homologe Rekombination zwischen der Zell-DNA und großen in die Zellen eingeführten DNA-Fragmenten erreicht. Die Rekombinationshäufigkeit liegt bei 50 % und mehr. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, Zell-DNA in einzelnen Bereichen genau zu untersuchen und deren Funktion aufzuklären. Insbesondere können einzelne Bereiche, wie Gene oder Teile davon, gezielt verändert werden. Damit ist es möglich, Gendefekte zu therapieren und neue Eigenschaften einer Zell-DNA zu verleihen. Die vorliegende Erfindung hat somit größte Bedeutung für den Bereich der Tierzucht und der Medizin, insbesondere für die Erkennung und das Verstehen von erblich bedingten Erkrankungen sowie deren Therapie.

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

**Beispiel:**     **Veränderung einer Zell-DNA durch homologe Rekombination mit großen DNA-Fragmenten**

Eine YAC-Bibliothek von Maus-DNA (vgl. Larin, Z. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88, (1991), 4123) wurde mit einem Tyrosinase-cDNA-Klon, pmcTyr102 (vgl.

- 4 -

Ruppert, S. et al., EMBO J. 7, (1988), 2715) einer Koloniefilter-Hybridisierung unterzogen. Es wurden Kolonien identifiziert, von denen eine, eine 860 kb große YAC-DNA aufwies, die ein intaktes Maus-Tyrosinase Gen enthielt. Diese YAC-DNA wurde zur Mikroinjektion in befruchtete Oozyten einer Albino-Maus (vgl. Hogan, B. et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1986), Cold Spring Harbor, New York) NMRI/Han verwendet. Hierzu wurde die YAC-DNA in einem Mikroinjektionspuffer, 100 mM NaCl, 10 mM HCl, pH 7.5, 0,1 mM EDTA, 30  $\mu$ m Spermin, 70  $\mu$ m Spermidin, aufgenommen. Die Konzentration betrug 4 ng YAC-DNA/ $\mu$ l Mikroinjektionspuffer. YAC-DNA-aufweisende Oozyten (etwa 390) wurden zur Einpflanzung in 12 pseudoschwangere weibliche Mäuse vorstehenden Stammes verwendet. Es wurden Mäuse-Nachkommen erhalten, die eine Pigmentierung des Auges und der Haut aufwiesen.

Zum Nachweis der homologen Rekombination zwischen der Maus-Zell-DNA und der YAC-DNA wurden eine Fish-Analyse und eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

5

- (a) Bei der Fish-Analyse wurde die Milz vorstehender Mäuse-Nachkommen isoliert und zerkleinert in eine 10 ml Spritze eingebracht. Dann wurde durch zwei Schichten Flor filtriert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in RPMI 1640-Medium resuspendiert, das 20 % fötales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 % Glutamin enthielt. Für die Stimulierung der Zellen durch Mitogene wurden 6  $\mu$ g/ml Conavalin A und 150  $\mu$ g/ml  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Die mitotische Arretierung, die hypotonische Behandlung, die Methanol/Essigsäure-Fixierung und das Ausbreiten von Chromosomen und Kern wurden in üblicher Weise durchgeführt. Geeignete DNA-Proben, z.B. Fragmente des Tyrosinase-Gens, wurden durch Nick-Translation unter Verwendung von Biotin oder Dioxygenin-modifizierten Nukleotiden markiert. Die in-situ-Hybridisierung, der Probenachweis und die mikroskopische Analyse wurden in üblicher Weise durchgeführt. Die hybridisierten Proben wurden durch FITC und Rhodamin oder Cy3, gekoppelt an Avidin bzw. Anti-Dioxygeninantikörpern, nachgewiesen. Chromosomen wurden durch DAPI gekennzeichnet. Die Bestim-
- 10
- 15
- 20

- 5 -

5 mung der chromosomalen Lokalisation der Proben wurde an einem Epi-  
fluoreszenzmikroskop zweifach durchgeführt. Zum einen wurde eine  
konventionelle Mikrophotographie unter Verwendung von "multiple band  
pass"-Extitations- und Emissions-Filtern durchgeführt, welche die simulta-  
ne Sichtbarmachung von FITC, Rhodamin (oder Cy3) und DAPI erlauben.  
Zum anderen wurde eine digitale Bildanalyse durchgeführt, wo digitale  
Bilder für jedes Fluorochrom unter Verwendung einer CCD-Kamera erhal-  
ten werden, und die Bilder wurden nach sorgfältigem Anordnen über-  
lagert.

10

- (b) Bei der Southern Blot-Analyse wurde aus dem Schwanz vorstehender  
Mäuse-Nachkommen, Zell-DNA isoliert und mit HindIII gespalten. Diese  
DNA wurde einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und mit  
markierten HindIII-Fragmenten des bekannten Plasmids Y-RC16 hybri-  
disiert.

15

Aus beiden Nachweisverfahren geht hervor, daß die YAC-DNA durch homologe  
Rekombination in das endogene Tyrosinase-Gen der Maus-Zell-DNA aufgenom-  
men wurde, wobei die Rekombinationshäufigkeit bei 50 % lag.

20

**Patentansprüche**

- 5      1.      Verfahren zur gezielten Veränderung von Zell-DNA, dadurch gekennzeichnet, daß große DNA-Fragmente in Zellen eingebracht werden und die Zell-DNA durch homologe Rekombination mit den großen DNA-Fragmenten verändert wird.
- 10      2.      Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die großen DNA-Fragmente etwa 700 kb oder mehr aufweisen.
3.      Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die großen DNA-Fragmente etwa 1000 kb oder mehr aufweisen.
- 15      4.      Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die großen DNA-Fragmente regulatorische, kodierende und/oder nicht-kodierende Sequenzen umfassen.
- 20      5.      Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen für ein oder mehrere Gene bzw. Teile davon kodieren.
6.      Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die großen DNA-Fragmente Elemente umfassen, die zu ihrer Stabilität und/oder Replikationsfähigkeit beitragen.
- 25      7.      Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Elemente ein Telomer, ein Zentromer und/oder einen Replikationsursprung umfassen.
- 30      8.      Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Elemente YAC- oder BAC-DNA sind oder von diesen stammen.



- 7 -

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen von Mensch oder Tier stammen.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Tier ein Labortier oder ein Nutztier ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen befruchtete Eizellen oder somatische Zellen sind.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Einbringen der großen DNA-Fragmente in die Zellen durch Mikroinjektion erfolgt.
- 15 13. DNA-Fragmente zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 12, wie sie in einem der Ansprüche 2 - 8 definiert sind.

